

КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИХ МОДУЛЯТОРЫ

©2014 г. Д. И. ОСМАКОВ, Я. А. АНДРЕЕВ,
С. А. КОЗЛОВ*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Структура ASIC. III. Электрофизиологические свойства ASIC. IV. Роль ASIC в физиологических процессах. V. ASIC и патологические состояния. VI. Модуляторы активности ASIC. VII. Заключение

I. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день, одной из актуальных задач биохимии является поиск и/или создание молекулярных инструментов для исследования механизмов функционирования сенсорных систем живых организмов как в нормальном, так и патологическом состояниях. Интересным объектом для исследований являются кислоточувствительные ионные каналы, или ASIC (от acid-sensing ion channel), относящиеся к надсемейству амилорид-чувствительных дегенерин/эпителиальных (DEG/ENaC) Na⁺-каналов [1].

ASIC каналы в большом количестве встречаются в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) [2, 3], где было обнаружено по крайней мере три (ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b) субъединицы из

Принятые сокращения: АК – арахидоновая кислота; а.о. – аминокислотный остаток; ASIC – кислоточувствительный ионный канал; ВПСИ – возбуждаемый постсинаптический потенциал; GMQ – 2-гуанидин-4-метилквиназолин; DEG/ENaC – амилорид-чувствительный дегенерин/эпителиальный Na⁺-канал; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; РсТХ1 – псалмотоксин 1; SLP3 – стоматин-подобный белок 3; ТМ – трансмембранный домен; ЦНС – центральная нервная система.

*Адрес для корреспонденции: serg@ibch.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 14-04-31578, № 12-04-01068), программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальная наука – медицине», гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (НШ-1924.2014.4)

шести известных. Среди всех субъединиц, представленных в мозге, ASIC1a является основной. Гомомерные ASIC1a и гетеромерные ASIC1a/2b каналы способны проводить как ионы Na^+ , так и Ca^{2+} [4, 5]. Показано, что ASIC1a и ASIC2 принимают непосредственное участие в процессах синаптической пластичности, обучении, передаче нервного возбуждения [3, 6], ишемических процессах и гибели нейронов [7–10], а также эпилепсии [11].

В нейронах периферической нервной системы в основном представлены гомомерные ASIC3 и гетеромерные ASIC3-содержащие каналы [12]. Для этих каналов было показано, что они: а) участвуют в восприятии кислото-опосредованной, воспалительной и постоперационной боли [13–15]; б) вносят вклад в развитие первичной и/или вторичной механогиперчувствительности в мышцах [16]; в) участвуют в кожной и висцеральной механочувствительности и в восприятии боли от механических стимулов [17–19]; г) участвуют в восприятии болевых сигналов от легких и желудочно-кишечного тракта [20].

II. СТРУКТУРА ASIC

Нейрональные рецепторы, способные воспринимать экстрацеллюлярное снижение pH, были обнаружены еще в 1980 году [21], однако клонированы и охарактеризованы они были только в 1997 году [22]. Для млекопитающих установлено наличие четырех генов (*ACCN 1–4*), кодирующих, по меньшей мере, шесть субъединиц данных каналов (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4) [23]. Для различных представителей класса млекопитающих (крыс, мышей и человека) первичная структура ASIC каналов довольно консервативна. Так, изоформы крысиных ASIC имеют сходство аминокислотной последовательности между собой в пределах 45–80%. Помимо млекопитающих ASIC каналы были найдены у животных других классов, таких как лягувы (жабовидная рыба), миноги, акулы и пресноводная аквариумная рыбка *Danio rerio* [24, 25].

Функциональные ASIC представляют собой тримерные комплексы [26, 27], которые могут быть как гомомерными, так и гетеромерными [3, 5, 9, 28, 29]. Пространственная структура куриного ASIC изоформы 1a в 2007 году была разрешена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.9 Å (рис. 1) [26].

Как и у всех представителей Deg/ENaC каналов, мембранная топология индивидуальной субъединицы ASIC канала представляет собой два трансмембранных домена (TM1 и TM2), связанных большой

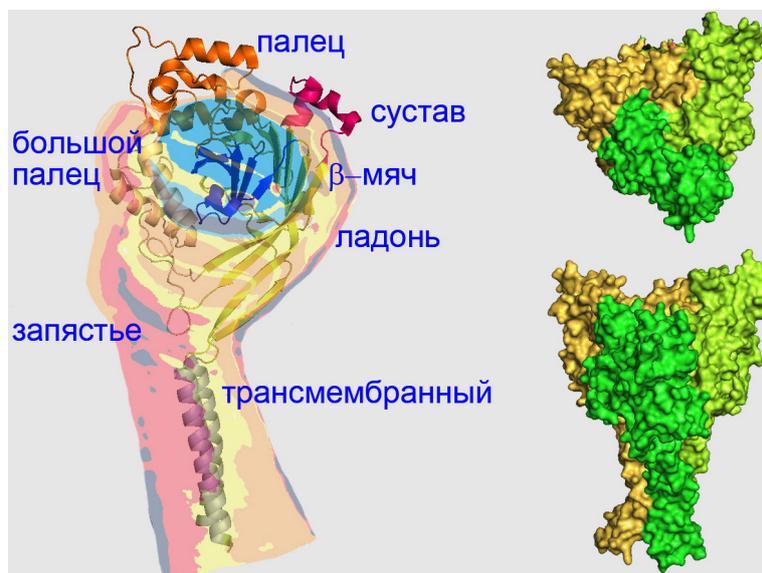


Рис. 1. Кристаллическая модель десенситизированного куриного ASIC1a канала (сASIC1a), который представлен без *N*- и *C*-концевых участков.

цистеин богатой экстрацеллюлярной петлей, с короткими внутриклеточными *N* и *C*-концевыми участками [30]. Домен *N*-концевого участка, примыкающий к ТМ1, отвечает за селективность канала к ионам Na^+ [31]. Проводящая пора в мембране формируется путем непосредственных контактов ТМ1 и ТМ2 доменов всех трех субъединиц [32]. Домен ТМ2 является высоко консервативным не только среди ASIC каналов, но также и среди представителей каналов DEG/ENaC семейства в целом [33]. Он участвует в образовании ворот десенситизации, в чем важную роль играют аминокислотные остатки (а.о.) Asp433–Gly436, причем боковые группы Asp433 направлены в просвет поры [27]. Также ТМ2 содержит сайт связывания амилорида и селективный фильтр, образуемый а.о. 443–445 [32, 33], а также два аминокислотных остатка, ответственных за блокирование ионами Ca^{2+} (для канала ASIC1a) [34].

Экстрацеллюлярный участок каждой субъединицы имеет форму «кисти, сжимающей мяч», состоящей из доменов «запястье» (wrist), «ладонь» (palm), «палец» (finger), «сустав» (knuckle), «β-мяч» (β-ball) и богатого цистинами домена «большой палец» (thumb) (рис. 1) [26, 27]. Он сформирован из 7 α -спиралей ($\alpha 1$ – $\alpha 7$) и 12 β -слоев ($\beta 1$ – $\beta 12$) [26], и стабилизирован за счет 14 дисульфидных связей, которые являются

довольно консервативными среди DEG/ENaC каналов [35]. Домен «ладонь» содержит 7 β -тяжей и является центральным элементом экстрацеллюлярной части, который формирует многочисленные контакты с другими доменами. Участок экстрацеллюлярной петли вблизи ТМ1 содержит дегенериновый сайт [36]. С ТМ доменами экстрацеллюлярная часть соединена через небольшой домен «запястье», состоящий всего из двух упорядоченных петель.

В ходе многочисленных исследований уже установлена важная функциональная роль для различных а.о. В β 10-слое в домене «ладонь», и в участке, расположенном между α 6 и α 7-спиралями в домене «сустав», находятся два консервативных сайта гликозилирования Asn367 и Asn394, играющих важную структурную роль в процессе восприятия протонов [26, 30, 37]. Остатки Asp107 в α 1 и Arg153 в α 3-спиралях домена «палец» у ASIC3 канала формируют кислотно-основное взаимодействие [38]. Остаток Trp287 домена «большой палец» и Tyr71 домена «запястье» у ASIC1 взаимодействуют между собой и участвуют в процессе открывания канала [39]. Пара остатков Asp79–Glu80 является консервативной для всех субъединиц ASIC каналов и связана с инактивацией канала ASIC3 [40], а у ASIC2a к тому же влияет на чувствительность к протонам [41]. His72 важен для восприятия изменений pH [42] и находится в непосредственной близости от домена, ответственного за кинетику десенситизации [43].

На границе раздела доменов «большой палец», «палец» и «ладонь» к каждой субъединице присоединяются ионы хлора, координирующиеся а.о. Arg310, Glu314 и Lys212 соседней субъединицы [26, 27]. Как показали эксперименты с замещением ионов хлора и мутагенезом координирующих а.о., присоединение Cl⁻ к каналу играет важную роль в процессе десенситизации канала [44].

На месте сочленения доменов «палец» и «большой палец» одной субъединицы и домена «ладонь» из соседней субъединицы расположен протон-чувствительный сенсор. Данная область, представляющая собой впадины на поверхности канала, богата кислотными остатками, поэтому она была названа «кислотный карман» (acidic pocket) [26, 41, 45]. Впадины имеют сильно выраженные отрицательные электростатические потенциалы, обусловленные наличием 12 кислотных остатков: Asp79, Glu420, Glu426, Asp433 в верхней и Glu80, Glu374, Glu412, Glu417 в центральной части поры. Предполагается, что впадины служат «катионными резервуарами», концентрирующими катионы вблизи поры ионного канала, что обеспечивает надежную проводимость канала [46]. Привлечение бивалентных катионов к впадине снижает концентрацию ионов Na⁺

вблизи поры и, тем самым, препятствует току Na^+ , что наблюдается для ASIC3 в присутствии ионов Ca^{2+} [47].

Также было установлено, что петлевой участок, связывающий $\beta 9$ -слой домена «ладонь» и $\alpha 4$ -спираль домена «большой палец», играет существенную роль в передаче сигнала от экстрацеллюлярной части к трансмембранным доменам, что приводит к конформационной перестройке и открыванию канала [48]. Аминокислотные остатки пролинов, находящиеся в данной петле, обеспечивают резкий поворот, что приводит к сближению Trp287 и Tyr71 вблизи TM1 [49]. Конформационные изменения происходят также в домене «запястье», которые, предположительно, приводят к последующему скручиванию (или изгибу) TM1 и TM2. В процессе перехода канала из закрытого состояния в открытое или десенситизированное важные конформационные изменения происходят и в других доменах. Так, мутагенез различных а.о. человеческого ASIC1a (hASIC1a) определил целый ряд остатков, изменяющих кинетику открывания и закрывания поры: в участке между $\beta 1$ - $\beta 2$ -слоями и в $\beta 1$ -слое домена «ладонь»; в петле между доменами «ладонь» и «палец»; в петле между доменами « β -шар» и «палец»; в домене «палец» [40, 43, 50–52].

На основе обобщения результатов многочисленных экспериментов был предложен следующий общий механизм открывания канала в ответ на изменение pH: протонирование/депротонирование кислотных а.о. в домене «большой палец» может влиять на его взаимодействие с а.о., находящимися в домене «палец», что приводит к перемещению домена «большой палец». Далее сигнал посредством домена «запястье» передается TM доменам, что приводит к изменению угла наклона спиралей, расширению внеклеточного участка поры, сужению в области селективного фильтра и открыванию канала [32]. Открывание поры приводит к тому, что карбонильные кислороды главной цепи, а также атомы кислорода боковых цепей остатков, таких как Asp433, выстраиваются вдоль оси симметрии третьего порядка на пути следования ионов натрия. Продолжительное действие низкого pH вызывает взаимное сближение домена «запястье» и соседних $\beta 1$ и $\beta 12$ тяжей, что приводит к закупорке центрального участка поры и закрытию ионного канала (процесс десенситизации).

III. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ASIC

Электрофизиологические свойства и фармакологические профили ASIC каналов были тщательно изучены в гетерологических системах экспрессии [53], а также в нейронах различных участков мозга, таких как: кора [9], гиппокамп [29], полосатое тело [54], мозжечок [55], сетчатый ганглий [56], и спинной мозг [57]. На рис. 2 представлены типичные примеры ASIC токов, соответствующих гомомерным ASIC1a, 1b, 2a, и 3 каналам, экспрессированным в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Остальные субъединицы не образуют гомомерных активно-проводящих натрий каналов. Принципиально отличны по форме ответа на стимулирующий импульс – гомомерные ASIC3 каналы, которые при снижении pH внеклеточной среды обладают двухкомпонентным ответом, имеющим вид быстро инактивирующегося тока с большей амплитудой (быстрая компонента или пик) и медленно инактивирующегося тока с меньшей амплитудой (медленная компонента или плато).

Сходство аминокислотной последовательности между субъединицами ASIC1a и ASIC1b составляет приблизительно 70%, при этом ASIC1b при сходной форме регистрируемого тока отличаются по многим другим параметрам. Прежде всего, ASIC1b каналы представлены у млекопитающих только в периферических сенсорных нейронах [58]. На примере грызунов показано, что они непроницаемы для ионов Ca^{2+} , в то время, как ASIC1a каналы пропускают эти ионы [4]. Функционально важно то, что ASIC1b каналы активируются при более низких значениях pH (~6.5) (против pH~7.0 для ASIC1a), и, соответственно, имеют более низкое значение pH_{50} (pH, при котором активация каналов достигает половины от максимального значения) ~5.9 (против 6.8 для ASIC1a) [22].

Гомомерные ASIC2a каналы являются относительно нечувствительными к протонам (значение pH_{50} для них составляет 4.4) [59]. Функциональные гетеромерные каналы ASIC2a/1a были обнаружены в мозге млекопитающих [9, 29, 54]. В отличие от ASIC2a субъединиц, гомомерные ASIC2b субъединицы не образуют функциональные каналы, в природных объектах они всегда присутствуют в комплексе с другими субъединицами ASIC [5, 53, 59]. Например, каналы ASIC2b/1a участвуют в запуске гибели нейронов при ацидозе, вызванном ишемией [5].

ASIC3, подобно ASIC1b, представлен преимущественно в периферических сенсорных нейронах [57, 60–62]. Более того, для сенсорных нейронов из кожи крыс было показано, что при умеренном закислении среды преимущественный ответ дают именно ASIC3 [13].

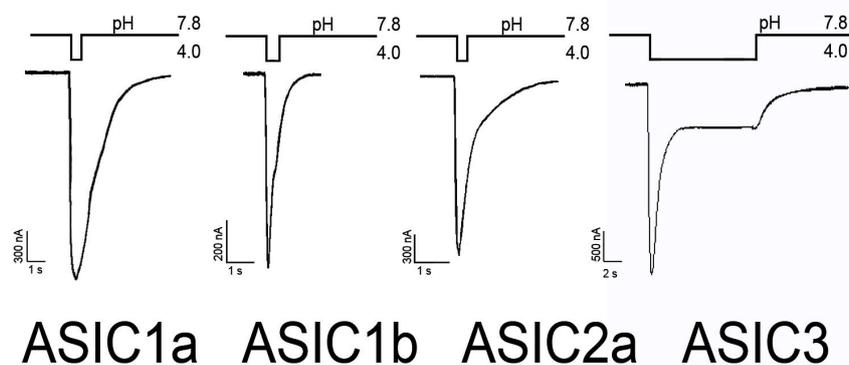


Рис. 2. Характерные входящие токи ASIC каналов. Измерения проводили на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих гомомерные каналы крысы, в конфигурации whole cell. Активацию ионного тока вызывали быстрой сменой растворов с различным значением pH (данные получены в лаб. нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН).

Электрофизиологические данные показали, что в сенсорных нейронах субъединицы ASIC3 функционируют как в виде гомомерных, так и гетеромерных каналов [28, 62, 63]. Они чувствительны к закислению среды, имеющей место как при физиологических, так и при патологических процессах, таких как кожная чувствительность, восприятие боли при воспалительных процессах и ишемии [60, 64–68].

Как уже было отмечено ранее, эти каналы имеют уникальный двухкомпонентный ответ на кислотный стимул. Быстрая компонента тока высоко чувствительна к протонам (pH_{50} 6.5), имеет большую амплитуду и быстро десенситизируется [53, 61]. Если происходит падение значения pH среды с 7.4 до уровня 6.5, а также <6.0, то происходит развитие медленной компоненты тока ASIC3, которая длится до тех пор, пока действует кислотный стимул [8, 22, 69]. При этом в генерации эффекта плато для различных интервалов pH (т.е., >6.5 и <6.0) задействованы различные структурные элементы канала [69]. Таким образом, в зависимости от интенсивности и продолжительности кислотного стимула форма регистрируемого тока через ASIC3 может быть различной: быстрая компонента, медленная компонента или сумма обеих компонент.

ASIC4 субъединицы представлены в гипофизе. Как и ASIC2b, они не формируют функциональных гомомерных каналов [70].

Для ASIC характерно то, что они могут переходить в состояние стационарной (steady-state) десенситизации (также известной как стационарная инактивация). Данный процесс имеет место при

небольшом, но длительном повышении концентрации протонов, длящимся в течение промежутка времени от нескольких секунд до нескольких минут [47, 71]. При этом последующая активация низкими значениями pH не приводит к появлению значительного тока. Как и в случае активации, процесс стационарной десенситизации опосредован присоединением протонов к специфическим сайтам в экстрацеллюлярной петле. Данные сайты инактивации имеют более высокую степень аффинности к протонам, чем сайты, ответственные за активацию канала [71].

IV. РОЛЬ ASIC В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

ASIC каналы были обнаружены в постсинаптической мембране и телах нейронов ЦНС [6]. Для данных каналов было продемонстрировано их взаимодействие с синапс-ассоциированным белком PSD-95, который играет важную роль в синаптической пластичности, и с киназа-1-взаимодействующими белками [72, 73]. Эти факты, а также то, что pH синаптической щели изменяется в процессе функционирования синапса, позволяет говорить о том, что ASIC могут оказывать влияние на синаптическую передачу. Это было продемонстрировано на примере нейронов гиппокампа мышей, нокаутных по ASIC1a каналу, которые показали отсутствие длительной потенциации возбудимого постсинаптического потенциала (ВПСП), продуцируемого высокочастотной стимуляцией, в отличие от мышей дикого типа [6]. На той же модели нокаутных мышей было показано отсутствие ингибирующего эффекта антагониста NMDA-рецепторов, D-2-амино-5-фосфоновалериата, на суммирование ВПСП, в отличие от мышей дикого типа, что демонстрировало эффект синергизма в работе ASIC1a каналов и NMDA-рецепторов [74].

ASIC1a каналы были обнаружены в миндалевидном теле, играющем важную роль в процессе тревожного поведения [3]. Было показано, что мыши, нокаутные по гену, кодирующему ASIC1a, значительно менее подвержены возникновению чувства тревоги в тесте «открытое поле», в ответ на резкие шумы и запах хищника [75]. При этом повышенная экспрессия каналов в организме приводила, наоборот, к усилению чувства тревоги [76], однако не влияла на возникновение необоснованной тревоги [77].

Также установлена роль ASIC1a каналов в развитии CO₂-опосредованного тревожного поведения. Показано, что повышение содержания CO₂ в воздухе, которым дышали подопытные мыши, приводило к снижению pH в мозге и вызывало развитие тревожного поведения.

Добавление буферного раствора, поддерживающего нормальный pH в области миндалевидного тела, значительно ослабляло симптомы тревожного поведения, однако снижение pH в данной области воспроизводило эффект от CO₂. Было продемонстрировано, что элиминирование/ингибирование ASIC1a каналов приводило к существенному снижению тревожной активности, тогда как повышенная экспрессия ASIC1a каналов в миндалевидном теле у мышей, дефицитных по данным каналам, наоборот, восстанавливала CO₂-опосредованное тревожное поведение. Таким образом, был показан один из возможных молекулярных механизмов, лежащих в основе развития чувства страха и тревожных расстройств [78].

Способность ASIC чувствовать изменение pH окружающей среды и генерировать ионный ток через клеточную мембрану ставит этот тип рецепторов в ряд основных сенсорных рецепторов. Главенствующая роль в процессах восприятия внешних стимулов у млекопитающих сегодня принадлежит ASIC3. У грызунов каналы ASIC3 представлены более чем в половине мышечных афферентов и более чем в трети DRG нейронов, иннервирующих коленный сустав [66, 68]. Они были обнаружены в специализированных кожных механосенсорных структурах, таких как тельца Мейснера, нервные окончания Меркеля, свободные нервные окончания и ланцетовидные нервные окончания, окружающие волосяную луковицу [65]. Описана роль ASIC3 в механочувствительности органов желудочно-кишечного тракта [17, 18].

Мыши с направленной делецией *ASIC3* (гена, кодирующего ASIC3) (*asic3*^{-/-} мыши) проявляли повышенную чувствительность к слабым механическим стимулам [65, 79]. Было показано также, что стоматин-подобный белок 3 (SLP3), реагирующий у мышей на прикосновение, *in vitro* ассоциируется с ASIC3 и не взаимодействует с TRPV1 рецептором, также играющим важную сенсорную роль. При этом SLP3 ингибировал ASIC-опосредованные токи в сенсорных нейронах, что указывает на участие ASIC3 в механосенсорных комплексах [80]. Пока отсутствие свидетельств непосредственной активации ASIC3 каналов от механических стимулов оставляет открытым вопрос об их прямом участии в механочувствительности [81].

Было показано участие ASIC3 в процессах слухового восприятия и зрения. Каналы ASIC3 были обнаружены в клетках спирального ганглия и Кортиева органа, находящихся в слуховой улитке. Дефицитные по ASIC3 мыши демонстрировали потерю слуха на ранних стадиях развития с последующим его восстановлением в двухмесячном возрасте [82]. Аналогичная инактивация ASIC3 приводила к негативным эффектам, схожим с таковыми при глаукоме и при хрониче-

ческой ишемии, связанными с дефектами во внутреннем сегменте «палочек» [83]. Это объясняется тем, что передача сигнала нейронам в сетчатке сильно зависит от pH внеклеточной среды [84].

Помимо этого ASIC3 каналы, несомненно, играют важную роль в процессах хемовосприятия, воспринимая сигналы в виде снижения pH внеклеточной среды, уровня ионов Ca^{2+} и некоторых метаболитов. Например, *asic3*^{-/-} мыши проявляли большую защищенность от развивающейся с возрастом непереносимости глюкозы, а также повышенную чувствительность к инсулину. Сходные результаты были получены и при введении мышам дикого типа ингибитора ASIC3 пептида APETx2, что лишней раз доказывало участие ASIC3 в развитии возрастной непереносимости глюкозы и устойчивости к инсулину [85].

Периферические ASIC3 играют важную роль в процессе восприятия боли и интегрировании сигналов при воспалительном процессе. Умеренный ацидоз в комбинации с гиперосмолярностью и арахидоновой кислотой вызывал болевые ощущения, связанные с воспалительным процессом, которые снижались при действии пептида APETx2, а также ASIC3-специфичной антисмысловой РНК [13]. Также, дефектные по ASIC3 каналу мыши демонстрировали практически отсутствие развития тепловой и механической гиперчувствительности, вызываемой воспалительным процессом при введении в подушечку лапы полного адьюванта Фрейнда или каррагенана [15, 86].

V. ASIC И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ

Во многих экспериментах с моделями нейродегенеративных заболеваний, затрагивающих органы ЦНС, было показано, что значительный вклад в восприятие повреждающих стимулов вносят ASIC. Так, на экспериментальных моделях аутоиммунного энцефаломиелимита у мышей, не экспрессирующих ASIC1a, было показано снижение уровня аксональной дегенерации по сравнению с мышами дикого типа. Измерения pH спинномозговой жидкости у мышей, больных аутоиммунным энцефаломиелимтом, показали закисление среды, достаточное для активации ASIC1a каналов, поэтому удаление гена, кодирующего ASIC1a, демонстрировало защитный эффект на нервных эксплантах *in vitro*. Такой же нейропротекторный эффект давала блокада ASIC каналов амилоридом [10]. Аналогично было продемонстрировано, что блокада ASIC1 амилоридом защищает как миелин, так и сами нейроны от повреждений в моделях острой боли [87]. Таким образом, была доказана роль ASIC1a в процессе аксональной дегенерации, что в свою очередь позволило предложить

использование ингибиторов ASIC1a для нейро- и миелопротекции при рассеянном склерозе [87].

Болезнь Паркинсона характеризуется нарушениями моторных функций и потерей дофаминэргических нейронов в *substantia nigra* [88]. Хотя механизм нейронального повреждения остается не совсем ясным, имеются данные, свидетельствующие, что затрагиваемые нейроны экспрессируют ASIC1a каналы [3, 89]. Блокада данного типа каналов, как амилоридом, так и псалмотоксином 1 (PcTX1) продемонстрировала нейропротекторное действие в области *substantia nigra* на моделях мышей, страдающих от болезни Паркинсона, вызванной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином [90].

Тревожные расстройства представляют собой изнурительные нейropsychические заболевания, лечение которых проводится в основном бензодиазепинами и селективными ингибиторами обратного захвата серотонина, вызывающими, однако, различные побочные эффекты. Использование ингибиторов ASIC1a, таких как PcTX1, A-317567 и амилорид, улучшало как параметры, связанные с вегетативной нервной системой, так и поведенческие параметры в моделях тревоги у грызунов [91].

При интенсивном нейрональном возбуждении в процессе эпилептического припадка наблюдается снижение pH в мозге [92, 93], что дало основание предположить участие ASIC1 каналов в эпилепсии. На моделях эпилептических припадков было показано, что действие ингибиторов ASIC1a значительно снижает силу и частоту возникновения потенциалов действия и длительную деполяризацию мембраны [94, 95]. Однако в других исследованиях, проведенных на ГАМК-эргических интернейронах, был продемонстрирован ингибирующий эффект, оказываемый ASIC1a на развитие припадка [11]. Полученные результаты говорят о том, что роль, которую играют ASIC каналы, и в частности ASIC1a, в развитии эпилептических припадков, является сложной и неоднозначной, зависящей от множества факторов, таких как природа вызывающего припадок стимула, локализация в мозге, а также возраст нейронов [96].

Накопление молочной кислоты, имеющее место при анаэробном гидролизе в условиях нехватки кислорода, а также высвобождение протонов при гидролизе АТФ приводит к снижению pH и ацидозу мозга [97], который играет важную роль при повреждении мозга при ишемии [98] и напрямую связан с силой инфаркта [99]. В культурах кортикальных нейронов мыши и человека, например, активация ASIC каналов при действии раствора с низким pH приводила к нейрональному повреждению, которое ингибировалось специфичной блокадой ASIC1a, а также делецией гена, кодирующего ASIC1a [100]. В моделях

ишемии мозга у грызунов, интрацеребровентрикулярное введение блокатора ASIC1a уменьшало силу инфаркта более чем на 60% [9, 101]. Сходное нейропротекторное действие наблюдалось у мышей, нокаутных по гену, кодирующему ASIC1a [9].

Аналогично ASIC3 каналы в периферической нервной системе сильно ассоциированы с патологиями различных органов. Исследования показали, что снижение pH до значения 6.7 приводит к активации ASIC3 канала в нейронах, иннервирующих сердечную мускулатуру. На основе косвенных данных (действие низкого pH, молочной кислоты) было сделано предположение о важной сенсорной роли ASIC3 каналов при сердечной ишемии и стенокардии [8]. Представители ASIC каналов, особенно ASIC3, рассматривают в качестве важных участников при восприятии висцеральной боли от механических стимулов в органах ЖКТ [18]. В нескольких моделях острой и хронической болей (как то, тепловая, химическая, механическая, воспалительная и нейропатическая модель) на грызунах был продемонстрирован важный вклад ASIC1a в развитие болевых ощущений. Интратекальное или интрацеребровентрикулярное введение специфического ингибитора ASIC1a PcTX1 или введение антисмысловых олигонуклеотидов приводит в обоих случаях к значительному анальгетическому эффекту [102, 103]. Было установлено, что ингибирование ASIC1a вызывает активацию эндогенного энкефалинового пути, что приводит к повышению уровня Met-энкефалина в цереброспинальной жидкости, за счет чего, по всей видимости, и наблюдалось обезболивающее действие [102].

VI. МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ASIC

Как видно из двух предыдущих разделов ASIC, особенно тип 1a и 3 вовлечены в широкий круг процессов в животных организмах. Их неправильное функционирование приводит к разнообразным патологическим состояниям, что можно скорректировать и подробно изучить, используя разнообразные лиганды. Сегодня известно уже достаточно большое количество эндогенных и экзогенных лигандов, которые могут непосредственно активировать кислоточувствительные каналы или изменять уровень проводимости каналов в большую или меньшую сторону при их активации протонами. В таблице мы суммировали все известные научные данные о модуляторах ASIC. Эти молекулы имеют различную химическую природу и не всегда селективно взаимодействуют с ASIC. Пока наибольший практический интерес представляют низкомолекулярные соединения, их структура представлена на рис. 3.

Таблица.
Фармакология гомомерных ASIC каналов

Фармакология	ASIC1a	ASIC1b	ASIC2a	ASIC3
1	2	3	4	5
Катионы				
Ca ²⁺	↓* (IC ₅₀ 1.3 мМ)** [34]	↓ 80% при C=10 мМ [104]		↓ 40% при C=10 мМ [104]
Zn ²⁺	↓ (IC ₅₀ 7 нМ) [105]	↓ (IC ₅₀ 26 мкМ) [106]	↑ (EC ₅₀ 120 мкМ) [42]	↓ пика и плато (IC ₅₀ 61 мкМ) [107]
Cu ²⁺	↓ в нейронах коры, гиппокампа и гипоталамуса (IC ₅₀ для нейронов гипоталамуса 46.8 мкМ) [108]			
Gd ³⁺				↓ (IC ₅₀ ~40 мкМ) [109]
Спермин	увеличение тока стационарной инактивации при C = 0.25 мМ [71]			
Низкомолекулярные компоненты				
Амилорид	↓ (IC ₅₀ ~10 мкМ) [22]	↓ (IC ₅₀ ~20 мкМ) [110]	↓ (IC ₅₀ ~28 мкМ) [36]	↓ пика (IC ₅₀ 10–60 мкМ) [61, 111] ↑ плато (EC ₅₀ 0.56 мМ) [112]
A-317567	↓ (IC ₅₀ 2 мкМ) [113]		↓ (IC ₅₀ 30 мкМ) [113]	↓ пика и плато (IC ₅₀ ~10 мкМ) [113]
НПВП	↓ (IC ₅₀ ~350 мкМ) (ибупрофен/флурбипрофен) [114]		↓ на 40% при C = 500 мкМ (диклофенак) [114]	↓ плато (IC ₅₀ 260 мкМ (аспирин); ~90 мкМ (диклофенак) [114])
Аминогликозиды	↓ в DRG нейронах (IC ₅₀ 30 мкМ (неомицин), 40 мкМ (стрептомицин)) [115]			
Арахидоновая кислота	↑ при C = 5–10 мкМ [116]			
Диариламидины (при 3 мкМ диминазена)	↓ 40% [117]	↓ 90% [117]	↓ 50% [117]	↓ 70% [117]
GMQ				☼ (EC ₅₀ 1.1 мМ) [118]
Серотонин				↑ плато (EC ₅₀ 40 мкМ) [119]
Севанол	↓ (IC ₅₀ ~2 мМ) [120]			↓ (IC ₅₀ 350 мкМ (пик); 230 мкМ (плато)) [120]

Окончание табл. см. на сл. стр.

Окончание табл. (начало табл. см. предыдущую стр.)

1	2	3	4	5
Соединения пептидной природы				
RF-амидные пептиды	↑ (EC ₅₀ ~30 мкМ (FMRFa)) [121]			↑ (EC ₅₀ ~50 мкМ (FMRFa)) [122]
Динорфины	↑ (EC ₅₀ (динорфин А) ~30 мкМ, EC ₅₀ (динорфин-32) ~25 нМ) [123]			
MitTx	☼ (EC ₅₀ ~10 нМ) [124]	☼ (EC ₅₀ 20 нМ) [124]	☼ и ↑ в 1000 раз C = 75 нМ [124]	☼ (EC ₅₀ ~830 нМ) [124]
PcTx1	↓ (IC ₅₀ ~0.9 нМ) [125]	↑ (EC ₅₀ ~100 нМ) [126]		
APETx2				↓ пика (IC ₅₀ 60 нМ (rASIC3), 175 нМ (hASIC3)) [127]
Мамбалгины	↓ (IC ₅₀ 50 нМ) [128]	↓ (IC ₅₀ 190 нМ) [128]		
Hcr 1b-1				↓ пика (IC ₅₀ 5 мкМ) [129]
Ugr 9-1				↓ (IC ₅₀ 10 мкМ (пик), 1.5 мкМ (плато)) [130]

* ↓ – ингибирующий эффект, ↑ – потенцирующий эффект, ☼ – активация.

** – Результаты, представленные в таблице, получены в различных экспериментальных системах, при различных активирующих стимулах рН (см. оригинальные работы по условиям измерения).

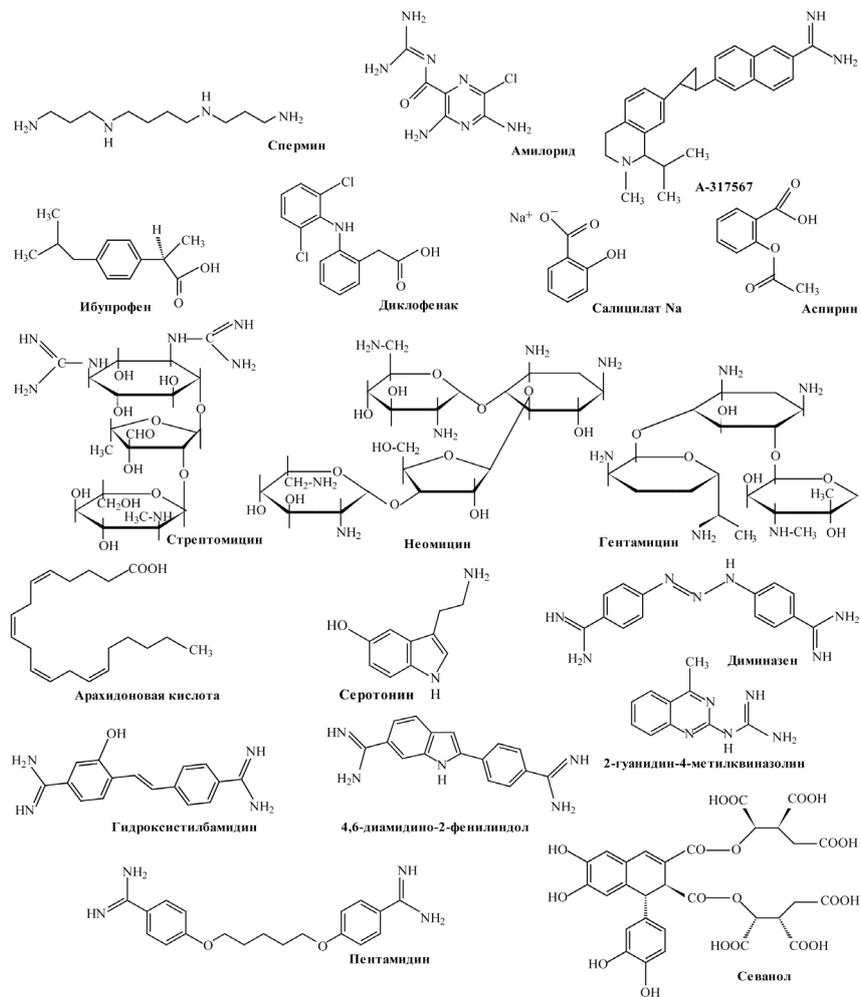


Рис. 3 Низкомолекулярные модуляторы ASIC.

ЭНДОГЕННЫЕ ЛИГАНДЫ

Арахидоновая кислота (АК), полиненасыщенная жирная кислота, представленная в составе фосфолипидов всех клеточных мембран. Она выполняет не только функции вторичного мессенджера, но также играет важную роль в различных патологических состояниях, таких как воспалительный процесс и ишемическое повреждение мозга [131]. Было установлено, что АК усиливает активацию ASIC каналов. Исследования на клетках Пуркинье показали, что после предварительной инкубации с 5–10 мкМ раствором АК амплитуда как быстрой, так и медленной составляющих тока каналов ASIC возрастала [55].

Серотонин (или 2-гидрокситриптамин), являющийся одним из провоспалительных агентов, оказывает потенцирующее действие на длительную компоненту тока ASIC3 каналов. Эффект наблюдается при значениях активирующего рН от 6.0 и ниже. В модели воспалительной боли на мышцах серотонин демонстрировал значительное усиление болевого эффекта, что не наблюдалось у мышей, дефицитных по гену, кодирующему ASIC3 [119].

Тетрапептид FMRF-амид и подобные ему по структуре пептиды способны потенцировать H^+ -опосредованные токи ($EC_{50} \sim 10\text{--}50$ мкМ для FMRF-амида) [121]. FMRF-амид не встречается у млекопитающих, однако другие пептиды этой группы, такие как NPFF, NPAF, и NPSF, широко представлены в различных отделах ЦНС. При хроническом воспалительном процессе наблюдается повышенный уровень содержания NPFF в спинном мозге. NPFF также обнаружен в малых и средних DRG нейронах. Предполагается, что модуляция ASIC эндогенными RF-амидными пептидами осуществляется в ответ на сильное закисление среды. Было показано, что RF-амиды взаимодействуют с экстрацеллюлярным доменом и вызывают увеличение амплитуды тока, а также замедляют десенситизацию ASIC1 и ASIC3 (но не ASIC2a), так как снижают протонную чувствительность сайтов, ответственных за процесс стационарной десенситизации [121, 122, 132, 133].

Динорфины представляют собой класс эндогенных опиоидных нейропептидов, обильно представленных в ЦНС. Они принимают участие в различных физиологических процессах, включая обезболивание и передачу нейроэндокринного сигнала. Для высоких концентраций динорфина А была показана его способность потенцировать активированные кислотным рН токи в кортикальных нейронах, а также в клетках СНО, экспрессирующих гомомерные ASIC1a [123]. В случае экспрессированных каналов было установлено, что

потенцирование опосредуется лимитирующим действием на процесс стационарной десенситизации и не зависит от активности опиоидных рецепторов, то есть происходит при непосредственном воздействии пептидов на ASIC1a канал. При этом угнетающий эффект, который динорфины оказывали на процесс стационарной десенситизации, негативным образом сказывался на нейронах, подвергающихся длительному ацидозу [123]. Поэтому считается, что динорфины могут усиливать повреждения мозга при патологических состояниях, связанных с ишемией.

ASIC каналы модулируются бивалентными катионами, прежде всего ионами Ca^{2+} , которые играют важную роль в регуляции различных потенциал-зависимых и лиганд-зависимых ионных каналов. Эффект от изменения концентрации Ca^{2+} во внеклеточной среде на ASIC зависит от того, присутствуют ли ионы Ca^{2+} при активации каналов или нет. Коаппликация Ca^{2+} с кислотным раствором ингибирует активацию каналов [25, 61]. Напротив, отсутствие ионов Ca^{2+} усиливает активацию ASIC при действии кислотного раствора [71, 134]. Исследования механизмов, лежащих в основе модулирующего действия ионов Ca^{2+} , позволили установить, что Ca^{2+} понижает аффинность каналов (на примере ASIC3) к ионам H^+ [71]. Было сделано предположение, что при pH 7.4 ASIC3 каналы находятся в закрытом состоянии из-за блокады ионами Ca^{2+} . При понижении pH присоединение протонов к каналу приводит к диссоциации ионов Ca^{2+} из их сайтов связывания и, как следствие, открытию канала [47]. Для ASIC1a было установлено, что имеются два сайта связывания Ca^{2+} : один служит для поровой блокады ионами Ca^{2+} , другой опосредует Ca-зависимую регуляцию активации протонами [34, 135].

При физиологических значениях pH и концентрации Ca^{2+} также играют важную роль в регуляции работы ASIC каналов ионы цинка. В клетках СНО, экспрессирующих различные комбинации субъединиц ASIC было показано, что Zn^{2+} в наномолярной концентрации ингибирует токи, генерируемые гомомерными ASIC1a и гетеромерными ASIC1a/2a каналами. Действие этого катиона приводило как к уменьшению амплитуды тока, так и к снижению аффинности ASIC1a к протонам. Было показано, что Lys133, расположенный в начале $\alpha 2$ -спирали в домене «палец», участвует в высоко аффинном процессе ингибирования ионами Zn^{2+} [105]. При микромолярных концентрациях ионы Zn^{2+} вызвали дозозависимый ингибирующий эффект ASIC1b (IC_{50} 26 мкМ) [106] и ASIC3 каналов (IC_{50} 61 мкМ) [107]. Ингибирующий эффект также был обусловлен взаимодействием Zn^{2+} с сайтом связывания, находящимся в экстрацеллюлярном участке ASIC1b и ASIC3 каналов. При мутагенезе каналов было

доказано участие остатка Cys149, находящегося в домене «палец» ASIC1b субъединицы, в чувствительности к ионам Zn^{2+} [106]. При концентрации более 100 мкМ Zn^{2+} взаимодействует также и с низко-аффинным сайтом связывания на ASIC2a субъединице, что ведет к повышению аффинности к протонам и потенциации активности ASIC2a-содержащих каналов [42].

Ионы меди (Cu^{2+}) оказывают модулирующее действие на каналы ASIC, что было показано на культуре клеток гипоталамуса, гиппокампа и нейронов коры мозга. Медь в дозозависимой степени уменьшает амплитуду ASIC токов, а также оказывает замедляющее действие на процесс десенситизации [108]. Микромолярные концентрации ионов меди ослабляют кислотоиндуцированную деполяризацию мембраны, поэтому ионы Cu^{2+} можно рассматривать как эндогенный модулятор, снижающий повышенную нейрональную возбудимость [108].

Спермин (поливалентный катион) способен оказывать потенцирующее действие на активность ASIC1a и ASIC1b каналов [71]. Было показано, что спермин усугубляет эффект повреждения нейронов при ишемии путем повышения чувствительности ASIC1a к закислению внеклеточной среды [136]. Фармакологическая блокада ASIC1a или делеция гена, кодирующего ASIC1, в значительной степени снижала эффект спермина при повреждении нейронов от ишемии, как в культуре диссоциированных нейронов, так и на модели фокальной ишемии у мышей [136]. Спермин снижает десенситизацию ASIC1a в открытом состоянии, а также ускоряет восстановление после десенситизации в ответ на повторяющиеся кислотные стимулы. Функционально, усиление активности канала сопровождается повышенной кислотоиндуцированной деполяризацией нейронов и перегрузкой цитоплазмы ионами Ca^{2+} , что может объяснить усиление негативного эффекта от действия спермина при повреждении нейронов. Следовательно, спермин вносит существенный вклад в повреждение нейронов при ишемии, отчасти за счет усиления активности рецепторов ASIC1a.

ЭКЗОГЕННЫЕ ЛИГАНДЫ

Амилорид – неспецифический блокатор Na^+ каналов применяется в медицине как K^+ -задерживающий диуретический агент, но помимо этого широко применяется в качестве ингибитора ASIC в научных исследованиях. По данным множественных исследований он ингибирует ток ионов, проводимый данными каналами, со значением IC_{50} 10–60 мкМ. В случае ASIC3 добавление амилорида вызывает комплексный ответ. Так ингибирующему действию подвергается только пиковая компонента тока, в то время как для плато при низких

концентрациях эффекта не наблюдается или наблюдается потенцирование при более высоких концентрациях (EC_{50} 0.5 мМ, и pH 7.4–6.8) [8, 9, 22, 54, 58, 112]. Основываясь на данных, полученных при изучении ENaC, полагают, что механизм ингибирующего действия амилорида – прямое блокирование катионпроводящей поры канала [137]. Участок, находящийся перед TM2 доменом, играет важную роль при действии амилорида. Мутация по остатку Gly430 в этой области в значительной мере изменяет чувствительность ASIC2a к амилориду [36]. Амилорид подавляет кислотоиндуцированную боль в периферической сенсорной системе [86, 138], а также ацидозопосредованные повреждения нейронов в ЦНС [4, 9]. Однако, из-за его побочного действия на ионные каналы типа ENaC и T-тип Ca^{2+} каналов, а также из-за влияния на ионообменные системы (Na^+/H^+ - и Na^+/Ca^{2+} -обменники), представляется маловероятным, что амилорид может использоваться в качестве нейропротекторного средства в будущем.

A-317567 – небольшая молекула, отдаленно напоминающая по структуре амилорид, является еще одним неселективным блокатором ASIC. В DRG нейронах крыс эта молекула ингибирует ASIC1a, ASIC2a и ASIC3 со значением IC_{50} 2–30 мкМ [113]. В случае ASIC3 показано, что A-317567 блокирует как пиковую, так и продолжительную компоненты тока. Побочные эффекты A-317567 относительно амилорида минимальны, он не демонстрирует ни диуретической, ни натриуретической активности, что свидетельствует в пользу его большей специфичности по отношению к ASIC. Это соединение можно рассматривать как перспективный анальгетик, так как было показано эффективное подавление болевых ощущений у крыс в модели тепловой гиперчувствительности в дозе 5–10 мг/кг животного, что в 10 раз ниже дозы для амилорида [113].

Еще один катион Gd^{3+} (*гадолиний*) оказывает ингибирующее действие как на пиковую, так и на продолжительную компоненты тока гомомерных ASIC3 каналов, а также способен ингибировать гетеромерные ASIC2a/3 [109]. Известно, что ионы гадолиния блокируют активацию нейронов в ответ на растяжение [139]. Исходя из этого, было сделано предположение, что ингибирование ASIC3 и ASIC2a/3 токов ионами Gd^{3+} может являться доказательством участия ASIC3 содержащих каналов в восприятии механических стимулов [109].

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) широко применяются в качестве противовоспалительных и анальгетических агентов. Они подавляют синтез простагландинов, играющих основную роль при воспалительных процессах в тканях. Было показано, что НПВП ингибируют активность каналов ASIC в concentra-

циях, соответствующих их анальгетическим дозам. Ибупрофен и флурбипрофен, например, ингибируют ASIC1a-содержащие каналы со значением IC_{50} 350 мкМ (измерено на клетках линии COS). Аспирин и салицилат ингибируют ASIC3 содержащие каналы со значением IC_{50} 260 мкМ (измерено на культуре DRG нейронов), в то время как диклофенак ингибирует ASIC3 содержащие каналы со значением IC_{50} 92 мкМ (измерено на клетках линии COS) [114]. При этом аспирин, салицилат и диклофенак подавляют только продолжительную компоненту тока ASIC3. Также известно, что НПВП препятствуют воспалительно-опосредованному повышению экспрессии ASIC в сенсорных нейронах [114]. Предполагаемым механизмом действия НПВП является аллостерическое ингибирование каналов посредством замедления процесса восстановления после инактивации [140].

Аминогликозиды (стрептомицин, неомицин и гентамицин) представляют собой группу антибиотиков, для которых было показано блокирующее действие на широкий спектр рецепторов: Ca^{2+} -каналы, возбудимые аминокислотные рецепторы, TRPV1 (transient-receptor-potential V1) каналы [141]. В DRG нейронах стрептомицин и неомицин при концентрации 30 мкМ демонстрировали эффект существенного, обратимого уменьшения амплитуды ASIC токов, а также оказывали замедляющее действие на процесс десенситизации. При этом уменьшение концентрации ионов Ca^{2+} во внеклеточной среде усиливало действие стрептомицина и неомицина на процесс десенситизации [115].

Диариламидины широко использовались изначально для лечения заболеваний, вызванных простейшими, таких как трипаносомоз и лейшманиоз. Для четырех представителей диариламидинов – 4,6-диамидино-2-фенилиндол, диминазен, гидроксистилбамидин и пентамидин, был показан ингибирующий эффект на токи, генерируемые рецепторами ASIC в нейронах гиппокампа со значениями IC_{50} 2.8, 0.3, 1.5 и 38 мкМ, соответственно. Один из них – диминазен, также демонстрировал усиление процесса десенситизации ASIC токов в нейронах гиппокампа. Ингибирующее действие диминазена на ASIC токи в клетках CHO уменьшается в ряду $ASIC1b > ASIC3 > ASIC2a \geq ASIC1a$ [117].

2-гуанидин-4-метилквиназолин (GMQ), небольшая молекула, содержащая гуанидиновую группу и гетероцикл, способна активировать ASIC3 при нейтральных значениях pH, не оказывая при этом действия на ASIC1a, 1b и 2a (значение EC_{50} , измеренное на клетках CHO, составило 1 мМ). При этом активированные каналы обладают менее выраженной селективностью к ионам Na^+ . Предполагается, что

в результате присоединения GMQ трансмембранные домены претерпевают конформационные изменения, отличные от таковых при активации канала только протонами. С помощью сайт-направленного мутагенеза каналов было показано, что в активации молекулой GMQ канала ASIC3 задействованы остатки Glu79, Glu423, Leu77 и Arg376, находящиеся в небольшом углублении, расположенном у основания экстрацеллюлярного домена «ладонь» [118, 142]. GMQ активирует сенсорные нейроны и вызывает болевые ощущения, связанные с активацией ASIC3 [118].

Севанол (или 9,10-диизоцитриловый эфир эпифилловой кислоты), выделенный из уксуснокислого экстракта растения *Thymus armeniacus*, является первым природным низкомолекулярным соединением, ингибирующим обе компоненты тока канала ASIC3. Пиковая компонента тока ингибируется полностью (IC_{50} 353 мкМ), в то время как продолжительная компонента только на 45% (IC_{50} of 234±53 мкМ). При этом он также ингибирует проводимость экспрессированных в ооцитах лягушки ASIC1a, хотя и менее эффективно. На моделях кислотоиндуцированной боли и тепловой гиперчувствительности, вызванной воспалительным процессом, севанол в дозах 1–10 мг/кг демонстрировал ярко выраженный анальгетический эффект [120].

МОДУЛЯТОРЫ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ

Природные яды уже давно зарекомендовали себя наравне с растительными экстрактами, как незаменимый источник биологически активных соединений [143]. Именно в ядах животных за последнее время был обнаружен целый ряд молекул, имеющих полипептидную структуру, которые способны модулировать активность ASIC. Все известные на сегодня полипептиды заметно разнятся как по первичной, так и по пространственной структуре. Четыре различные по укладке полипептидной цепи пространственные структуры полипептидных модуляторов из природных ядов приведены на рис. 4.

Наибольший прогресс был достигнут в изучении *псалмотоксина 1*, выделенного из паука вида *Psalmopoeus cambridgei*, который является высоко селективным ингибитором рецептора ASIC1a [125]. PсTx1 небольшой полипептид, состоящий из 40 а.о., имеет массу 4689.4 Да и обладает ярко выраженными основными свойствами (pI 10.38, 9 положительно заряженных а.о.). Пространственная структура PсTx1 представляет собой плотно упакованную центральную область, скрепленную тремя дисульфидными связями, из которой выступают N- и C-концевые петли (рис. 4). Такая укладка получила название «ингибиторный цистеиновый узел» [144, 145], именно так

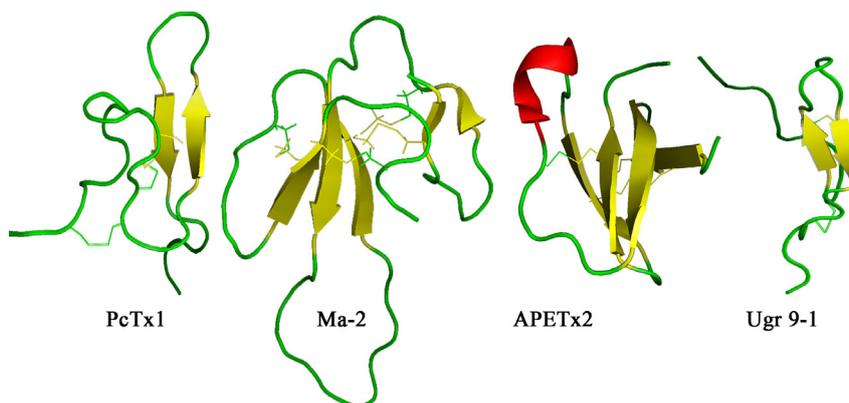


Рис. 4. Пространственная структура полипептидных модуляторов ASIC из яда паука – PcTx1 (PDB 2KNI), из яда змеи – Ma-2 (PDB 2MFA), из яда морской анемоны – APETx2 (PDB 1WXN) и Ugr 9-1 (PDB 2LZO).

упорядочены в пространстве большинство токсинов из ядов пауков, действующих на ионотропные рецепторы [146].

Природный PcTx1, а также его синтезированные аналоги, в равной степени обладают высокоаффинным ингибирующим эффектом на гомомерные ASIC1a каналы в различных клеточных экспрессионных системах (значение $IC_{50} < 1$ нМ). Связывание происходит при значении pH 7.4 с каналом в закрытом состоянии. Этот процесс является обратимым. Полное блокирование тока наблюдается при концентрации пептида 10 нМ [125]. Интересным фактом является то, что при значениях pH более 7.4 аппликация PcTx1 может приводить к активации ASIC1a [147]. Следует также отметить, что PcTx1 обладает потенцирующим эффектом на ASIC1b [126].

Функциональное исследование токсина показало, что Trp24, Arg26 и Arg27 играют существенную роль в активности PcTx1 [148]. Исследования химерных ASIC каналов, построенных из чувствительных и нечувствительных к действию PcTx1 субъединиц, компьютерное моделирование и сайт-направленный мутагенез ASIC1a показали, что полипептид присоединяется к каналу в участке «кислотного кармана», ответственном за pH-зависимое открывание канала [148–150]. Полученная в дальнейшем кристаллическая структура комплекса PcTx1 с каналом ASIC1a продемонстрировала, что в связывании принимают участие как гидрофобный участок на поверхности токсина, который взаимодействует с доменом «большой палец» канала, так и основной кластер (в особенности Arg26 и Arg27),

которые образуют водородные связи с а.о. канала в «кислотном кармане» [151].

Механизм действия PcTx1 связан с повышением аффинности ASIC1a к H⁺, таким образом, токсин переводит канал в состояние десенситизации, что в итоге приводит к неспособности канала активироваться [147]. Структурно-функциональные исследования высоко специфичного лиганда ASIC1a, токсина PcTx1, определили важную роль «кислотного кармана» в процессе pH-зависимого открывания канала.

В яде коралловой змеи *Micrurus tener tener* был найден полипептид *MitTx* – агонист всех функциональных подтипов ASIC, активирующий их при нейтральных значениях pH. *MitTx* демонстрировал различную специфичность по отношению к разным типам каналов, экспрессированных в ооцитах *Xenopus*, в наномолярной концентрации действуя на ASIC1a и ASIC1b подтипы (EC₅₀ = 9.4±1.3 и 23±3.6 нМ, соответственно), и в микромолярной концентрации действуя на ASIC2a и ASIC3 [124]. *MitTx* состоит из двух компонентов, *MitTx-α* и *MitTx-β*, нековалентно связанных друг с другом. *MitTx-α* – 6 кДа белок, сходный по структуре с ингибиторами протеаз Кунитц-типа, а *MitTx-β*, в свою очередь, сходен по структуре с фосфолипазой-A2 [124]. Весь комплекс *MitTx* сходен по структуре с токсином из яда змеи β-бунгаротоксином (PDB 1BUN), который в отличие от *MitTx* ингибирует K⁺ каналы.

На кристаллической структуре комплекса *MitTx* с ASIC1a каналом было установлено, что токсин присоединяется к доменам «запястье», «ладонь» и «большой палец» подобно бутылочной открывалке, при этом область связывания *MitTx-β* перекрывается с таковой для PcTx1. Для *MitTx-α* важную роль в связывании играет остаток Phe14, взаимодействующий с Ala82 и Thr84 в β1-β2-линкере одной субъединицы и Val361 и Met364 другой субъединицы, и остаток Lys16, взаимодействующий с участком на границе доменов «запястье» и TM1 [152].

Конформационные изменения, ведущие к открыванию канала при присоединении токсина, происходят в нижней части домена «ладонь», что приводит к расширению внеклеточного участка поры и перестройкам в α-спиралях TM доменов. При этом область селективного фильтра, образованная остатками Gly443, Ala445 и Ser446, вытягивается параллельно мембранной плоскости, разрывая спираль TM2-домена на две части, где нижняя часть одной субъединицы занимает положение таковой у соседней субъединицы, и карбонильные группы Gly443 образуют кольцо радиусом ~3.6 Å, обеспечивая селективность для прохождения ионов Na⁺ [152].

Еще два полипептида *мамбалгин-1* и *мамбалгин-2* (Ma-1 и Ma-2) были выделены из яда змеи *Dendroaspis polylepis polylepis*. Они состоят из 57 а.о. каждый и имеют в своем составе 8 цистеинов, образующих между собой 4 дисульфидные связи. Пептиды отличаются друг от друга одной заменой в 4 положении, Tug у Ma-1 или Phe у Ma-2. Структура мамбалгинов представляет собой плотноупакованную центральную область, стабилизированную четырьмя дисульфидными связями (Cys3–Cys19, Cys12–Cys37, Cys41–Cys49, и Cys50–Cys55), из которой выдаются три петли, формирующие два β-листа (рис. 4) [153]. Такая укладка, называемая трехпальцевые токсины, характерна для большого числа известных нейротоксинов змей.

Мамбалгины способны обратимо ингибировать рекомбинантные гомомерные ASIC1a, гетеромерные ASIC1a/2a и ASIC1a/2b, а также ASIC1b и ASIC1a/1b каналы со значениями IC₅₀ 55 нМ, 246 нМ, 61 нМ, 192 нМ и 72 нМ, соответственно [128]. Было показано также, что они ингибируют токи ASIC каналов в нейронах спинного мозга, гиппокампа и сенсорных нейронах. В тестах *in vivo* мамбалгины проявляли анальгетические эффекты в моделях острой и воспалительной боли как при воздействии на нейроны периферической нервной системы (что опосредовалось ингибированием преимущественно ASIC1b каналов), так и на нейроны ЦНС (посредством ингибирования ASIC1a и ASIC1a/2a каналов) [128].

Мамбалгины демонстрируют на поверхности молекулы сильный положительный электростатический потенциал, который может играть важную роль в связывании пептидов с ASIC каналами подобно PcTx1. При этом мамбалгины имеют другой механизм действия: они связываются с каналом в закрытом или инактивированном состоянии и изменяют аффинность канала к протонам [128]. Функциональные исследования на мутантах канала ASIC1a выявили важную роль остатка Phe350 для взаимодействия с мамбалгинами. Следует отметить, что данный участок канала, расположенный в непосредственной близости от «кислотного кармана», считается важным и для взаимодействия с PcTx1. Таким образом сайты связывания для мамбалгинов и PcTx1 перекрываются [154].

На сегодняшний день известны три полипептида из различных видов морских анемонов с ингибиторной активностью на ASIC3. Два из них относятся к наиболее многочисленному структурному классу 1, и еще один – к одному из самых редких – структурному классу 9 [155].

Полипептид *APETx2*, основной компонент яда морской анемоны *Anthopleura elegantissima*, содержит 42 а.о., имеет массу 4561.1 Да и обладает основными свойствами (pI 9.59). Полипептид обратимо

ингибирует ASIC3 каналы, экспрессированные в ооцитах или клетках млекопитающих ($IC_{50} = 63$ нМ), подавляя при этом только пиковую компоненту тока [127]. Пространственная структура токсина была определена спектроскопией ЯМР, она представляет собой компактную центральную область с тремя дисульфидами (Cys4–Cys37, Cys6–Cys30, Cys20–Cys38), из которой выступают основная петля (остатки 15–27) и N- и C-концевые участки (рис. 4) [156]. По пространственной структуре APETx2 относится к типу дефензинов (β -дефензин подобные пептиды), включающему антимикробные пептиды из человека, а также некоторые токсины из ядов змей, морских анемонов и утконоса. Вычисленный на основе структуры пептида дипольный момент позволил выделить гидрофобно-ароматический кластер на поверхности молекулы токсина, образованный а.о. Phe15, Tyr16, Arg17, Arg31 и Phe33, который, вероятно, играет важную роль при взаимодействии APETx2 с каналом [156]. Данное предположение было частично подтверждено исследованиями, показавшими, что замены Arg17 и Phe15 снижали активность APETx2 по отношению к ASIC3 каналу мыши в 25 и 100 раз, соответственно [157, 158].

В экспериментах *in vivo* APETx2 проявлял значительный анальгетический эффект в модели кислотоиндуцированной мышечной боли и в модели воспалительной периферической боли у крыс [13, 159]. Следует отметить, что действие APETx2 не селективно, поэтому некий вклад в анальгетическое действие, проявляемое пептидом, вносит дополнительное ингибирование Na^+ -каналов. APETx2 оказывает ингибирующий эффект на потенциал-чувствительные Na^+ -каналы $Na_{v1.8}$ (IC_{50} 2.6 мкМ для DRG нейронов крысы) [160] и $Na_{v1.2}$ ($IC_{50} \sim 110$ нМ для каналов человека, экспрессированных в ооцитах *Xenopus*) [161].

Близкий структурный аналог APETx2 – полипептид *Hcr 1b-1* – был выделен из спиртового экстракта морской анемоны *Heteractis crispa*. Он имеет массу 4537 Да и состоит из 41 а.о., в числе которых 6 остатков цистеина, образующих между собой 3 дисульфидных связи. Пептид обратимо ингибирует быструю компоненту тока ASIC3 каналов человека со значением IC_{50} 5.5 мкМ [129].

Принципиально отличный по структуре полипептид *Ugr 9-1* получен из яда морской анемоны *Urticina grebelnyi*. Его молекулярная масса 3135 Да, и он является самым коротким полипептидом, способным модулировать активность ASIC. Пространственная структура *Ugr 9-1* представляет собой β -шпильку и пять β -поворотов, стабилизированные двумя дисульфидными связями, в то время как длинная N-концевая и короткий C-концевой участки выдаются из плотной центральной области β -структуры (рис. 4) [130].

Пептид Ugr 9-1 обладает ингибирующим действием на пиковую и продолжительную компоненты тока ASIC3, не оказывая эффекта на остальные изоформы кислоточувствительных каналов. Это отличает биологические свойства Ugr 9-1 от других токсинов морских анемонов – APETx2 и Hcr 1b-1, которые ингибируют только пиковую компоненту тока. Пиковая компонента ингибировалась при добавлении токсина полностью (IC_{50} 10 мкМ), а продолжительная компонента только на 48% (IC_{50} 1.44 мкМ). В моделях *in vivo* Ugr 9-1 в дозах 0.1–0.5 мг/кг проявлял значительный анальгетический эффект (кислотоиндуцированные боли и тепловая гиперчувствительность) [130].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ASIC каналы относятся к группе белков с крайне важной регуляторной и сенсорной функцией для нейронов периферической системы и ЦНС. Обнаруживается все больше и больше примеров, демонстрирующих участие данных каналов (в особенности ASIC1a и ASIC3) как в физиологических, так и в патологических процессах. Комбинацией методов биохимии, молекулярной биологии, а также с помощью структурных и функциональных исследований, удалось достичь некоторого прогресса в установлении механизмов функционирования этих каналов, прежде всего посредством изучения взаимодействия данных рецепторов со своими лигандами. Эти исследования позволяют не только понять фундаментальные основы функционирования этих каналов, но также являются серьезным заделом для создания эффективных лекарственных препаратов для лечения целого ряда патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kellenberger, S., Schild, L. (2002) Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure, *Physiol. Rev.*, **82**, 735–767.
2. Alvarez de la Rosa, D., Krueger, S.R., Kolar, A., Shao, D., Fitzsimonds, R.M., Canessa, C.M. (2003) Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system, *J. Physiol.*, **546**, 77–87.
3. Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., Welsh, M.J. (2003) Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning, *J. Neurosci.*, **23**, 5496–5502.
4. Yermolaieva, O., Leonard, A.S., Schnizler, M.K., Abboud, F.M., Welsh, M.J. (2004) Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6752–6757.

5. Sherwood, T.W., Lee, K.G., Gormley, M.G., Askwith, C.C. (2011) Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death, *J. Neurosci.*, **31**, 9723–9734.
6. Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H., et al. (2002) The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory, *Neuron*, **34**, 463–477.
7. Gao, J., Duan, B., Wang, D.-G., Deng, X.-H., Zhang, G.-Y., Xu, L., Xu, T.-L. (2005) Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death, *Neuron*, **48**, 635–646.
8. Yagi, J., Wenk, H.N., Naves, L.A., McCleskey, E.W. (2006) Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia, *Circ. Res.*, **99**, 501–509.
9. Xiong, Z.-G., Zhu, X.-M., Chu, X.-P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.-L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., et al. (2004) Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels, *Cell*, **118**, 687–698.
10. Friese, M.A., Craner, M.J., Etzensperger, R., Vergo, S., Wemmie, J.A., Welsh, M.J., Vincent, A., Fugger, L. (2007) Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system, *Nat. Med.*, **13**, 1483–1489.
11. Ziemann, A.E., Schnizler, M.K., Albert, G.W., Severson, M.A., Howard, M.A., Welsh, M.J., Wemmie, J.A. (2008) Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a, *Nat. Neurosci.*, **11**, 816–822.
12. Babinski, K., Lê, K.T., Séguéla, P. (1999) Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties, *J. Neurochem.*, **72**, 51–57.
13. Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain, *EMBO J*, **27**, 3047–3055.
14. Deval, E., Noël, J., Gasull, X., De-launay, A., Alloui, A., Friend, V., Eschalier, A., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2011) Acid-sensing ion channels in postoperative pain, *J. Neurosci.*, **31**, 6059–6066.
15. Yen, Y.-T., Tu, P.-H., Chen, C.-J., Lin, Y.-W., Hsieh, S.-T., Chen, C.-C. (2009) Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation, *Mol. Pain*, **5**, 1.
16. Sluka, K.A., Winter, O.C., Wemmie, J.A. (2009) Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **12**, 693–704.
17. Jones, R.C.W., Xu, L., Gebhart, G.F. (2005) The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3, *J. Neurosci.*, **25**, 10981–10989.
18. Page, A.J., Brierley, S.M., Martin, C.M., Price, M.P., Symonds, E., Butler, R., Wemmie, J.A., Blackshaw, L.A. (2005) Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function, *Gut*, **54**, 1408–1415.
19. Fromy, B., Lingueglia, E., Sigaud-Roussel, D., Saumet, J.L., Lazdunski, M. (2012) Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers, *Nat. Med.*, **18**, 1205–1207.

20. Wulsch, T., Painsipp, E., Shahbazian, A., Mitrovic, M., Edelsbrunner, M., Lazdunski, M., Waldmann, R., Holzer, P. (2008) Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis, *Pain*, **134**, 245–253.
21. Krishtal, O.A., Pidoplichko, V.I. (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane, *Neuroscience*, **5**, 2325–2327.
22. Waldmann, R., Champigny, G., Basilana, F., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing, *Nature*, **386**, 173–177.
23. Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J. (2006) Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities, *Trends Neurosci.*, **29**, 578–586.
24. Coric, T., Zheng, D., Gerstein, M., Canessa, C.M. (2005) Proton sensitivity of ASIC1 appeared with the rise of fishes by changes of residues in the region that follows TM1 in the ectodomain of the channel, *J. Physiol.*, **568**, 725–735.
25. Paukert, M., Sidi, S., Russell, C., Siba, M., Wilson, S.W., Nicolson, T., Gründer, S. (2004) A family of acid-sensing ion channels from the zebrafish: widespread expression in the central nervous system suggests a conserved role in neuronal communication, *J. Biol. Chem.*, **279**, 18783–18791.
26. Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., Gouaux, E. (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH, *Nature*, **449**, 316–323.
27. Gonzales, E.B., Kawate, T., Gouaux, E. (2009) Pore architecture and ion sites in acid sensing ion channels and P2X receptors, *Nature*, **460**, 599–604.
28. Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., Snyder, P.M. (2002) Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2338–2343.
29. Askwith, C.C., Wemmie, J.A., Price, M.P., Rokhlina, T., Welsh, M.J. (2004) Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H⁺-activated currents in hippocampal neurons, *J. Biol. Chem.*, **279**, 18296–18305.
30. Saugstad, J.A., Roberts, J.A., Dong, J., Zeitouni, S., Evans, R.J. (2004) Analysis of the membrane topology of the acid-sensing ion channel 2a, *J. Biol. Chem.*, **279**, 55514–55519.
31. Coscoy, S., de Weille, J.R., Lingueglia, E., Lazdunski, M. (1999) The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore, *J. Biol. Chem.*, **274**, 10129–10132.
32. Li, T., Yang, Y., Canessa, C.M. (2011) Outlines of the pore in open and closed conformations describe the gating mechanism of ASIC1, *Nat. Commun.*, **2**, 399.
33. Kellenberger, S., Gautschi, I., Schild, L. (2002) An external site controls closing of the epithelial Na⁺ channel ENaC, *J. Physiol.*, **543**, 413–424.
34. Paukert, M., Babini, E., Pusch, M., Gründer, S. (2004) Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating, *J. Gen. Physiol.*, **124**, 383–394.
35. Benos, D.J., Stanton, B.A. (1999) Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels, *J. Physiol.*, **520**, 631–644.
36. Champigny, G., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. (1998) Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1, *J. Biol. Chem.*, **273**, 15418–15422.

37. Jing, L., Chu, X.-P., Jiang, Y.-Q., Collier, D.M., Wang, B., Jiang, Q., Snyder, P.M., Zha, X.-M. (2012) N-glycosylation of acid-sensing ion channel 1a regulates its trafficking and acidosis-induced spine remodeling, *J. Neurosci.*, **32**, 4080–4091.
38. Yang, Y., Yu, Y., Cheng, J., Liu, Y., Liu, D.-S., Wang, J., Zhu, M.X., Wang, R., Xu, T.-L. (2012) Highly conserved salt bridge stabilizes rigid signal patch at extracellular loop critical for surface expression of acid-sensing ion channels, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14443–14455.
39. Jing, L., Jiang, Y.-Q., Jiang, Q., Wang, B., Chu, X.-P., Zha, X.-M. (2011) The interaction between the first transmembrane domain and the thumb of ASIC1a is critical for its N-glycosylation and trafficking, *PLoS One*, **6**, e26909.
40. Cushman, K.A., Marsh-Haffner, J., Adelman, J.P., McCleskey, E.W. (2007) A conformation change in the extracellular domain that accompanies desensitization of acid-sensing ion channel (ASIC) 3, *J. Gen. Physiol.*, **129**, 345–350.
41. Smith, E.S.J., Zhang, X., Cadiou, H., McNaughton, P.A. (2007) Proton binding sites involved in the activation of acid-sensing ion channel ASIC2a, *Neurosci. Lett.*, **426**, 12–17.
42. Baron, A., Schaefer, L., Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. (2001) Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35361–35367.
43. Coric, T., Zhang, P., Todorovic, N., Canessa, C.M. (2003) The extracellular domain determines the kinetics of desensitization in acid-sensitive ion channel 1, *J. Biol. Chem.*, **278**, 45240–45247.
44. Kusama, N., Harding, A.M.S., Benson, C.J. (2010) Extracellular chloride modulates the desensitization kinetics of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a), *J. Biol. Chem.*, **285**, 17425–17431.
45. Paukert, M., Chen, X., Pollehn, G., Schindelin, H., Gründer, S. (2008) Candidate amino acids involved in H⁺ gating of acid-sensing ion channel 1a, *J. Biol. Chem.*, **283**, 572–581.
46. Dani, J.A. (1986) Ion-channel entrances influence permeation. Net charge, size, shape, and binding considerations, *Biophys. J.*, **49**, 607–618.
47. Immke, D.C., McCleskey, E.W. (2003) Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade, *Neuron*, **37**, 75–84.
48. Yang, H., Yu, Y., Li, W.-G., Yu, F., Cao, H., Xu, T.-L., Jiang, H. (2009) Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism, *PLoS Biol.*, **7**, e1000151.
49. Li, T., Yang, Y., Canessa, C.M. (2009) Interaction of the aromatics Tyr-72/Trp-288 in the interface of the extracellular and transmembrane domains is essential for proton gating of acid-sensing ion channels, *J. Biol. Chem.*, **284**, 4689–4694.
50. Li, T., Yang, Y., Canessa, C.M. (2010) Asn415 in the beta11-beta12 linker decreases proton-dependent desensitization of ASIC1, *J. Biol. Chem.*, **285**, 31285–31291.
51. Bargeton, B., Kellenberger, S. (2010) The contact region between three domains of the extracellular loop of ASIC1a is critical for channel function, *J. Biol. Chem.*, **285**, 13816–13826.
52. Springauf, A., Bresenitz, P., Gründer, S. (2011) The interaction between two extracellular linker regions controls sustained opening of acid-sensing ion channel 1, *J. Biol. Chem.*, **286**, 24374–24384.
53. Hesselager, M., Timmermann, D.B., Ahring, P.K. (2004) pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed

- combinations of acid-sensing ion channel subunits, *J Biol Chem*, **279**, 11006–11015.
54. Jiang, Q., Li, M.-H., Papasian, C.J., Branigan, D., Xiong, Z.-G., Wang, J.Q., Chu, X.-P. (2009) Characterization of acid-sensing ion channels in medium spiny neurons of mouse striatum, *Neuroscience*, **162**, 55–66.
 55. Allen, N.J., Attwell, D. (2002) Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals, *J. Physiol.*, **543**, 521–529.
 56. Lilley, S., LeTissier, P., Robbins, J. (2004) The discovery and characterization of a proton-gated sodium current in rat retinal ganglion cells, *J. Neurosci.*, **24**, 1013–1022.
 57. Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons, *J. Neurosci.*, **28**, 1498–1508.
 58. Chen, C.C., England, S., Akopian, A.N., Wood, J.N. (1998) A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10240–10245.
 59. Lingueglia, E., de Weille, J.R., Bas-silana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., Lazdunski, M. (1997) A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells, *J. Biol. Chem.*, **272**, 29778–29783.
 60. Lingueglia, E. (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception, *J. Biol. Chem.*, **282**, 17325–17329.
 61. Waldmann, R. (1997) Molecular Cloning of a Non-inactivating Proton-gated Na⁺ Channel Specific for Sensory Neurons, *J. Biol. Chem.*, **272**, 20975–20978.
 62. Lin, Y.-W., Min, M.-Y., Lin, C.-C., Chen, W.-N., Wu, W.-L., Yu, H.-M., Chen, C.-C. (2008) Identification and characterization of a subset of mouse sensory neurons that express acid-sensing ion channel 3, *Neuroscience*, **151**, 544–557.
 63. Hattori, T., Chen, J., Harding, A.M.S., Price, M.P., Lu, Y., Abboud, F.M., Benson, C. J. (2009) ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons, *Circ. Res.*, **105**, 279–286.
 64. Immke, D.C., McCleskey, E.W. (2001) Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons, *Nat. Neurosci.*, **4**, 869–870.
 65. Price, M. P., McIlwrath, S. L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D. E., Sluka, K. A., Brennan, T. J., Lewin, G. R., Welsh, M. J. (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice, *Neuron*, **32**, 1071–1083.
 66. Molliver, D.C., Immke, D.C., Fierro, L., Paré, M., Rice, F.L., McCleskey, E.W. (2005) ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons, *Mol. Pain*, **1**, 35.
 67. Sluka, K.A., Radhakrishnan, R., Benson, C.J., Eshcol, J.O., Price, M.P., Babinski, K., Audette, K.M., Yeomans, D.C., Wilson, S.P. (2007) ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation, *Pain*, **129**, 102–112.
 68. Ikeuchi, M., Kolker, S.J., Sluka, K.A. (2009) Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis, *J. Pain*, **10**, 336–342.
 69. Salinas, M., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2009) Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3, *J. Biol. Chem.*, **284**, 31851–31859.
 70. Akopian, A.N., Chen, C.C., Ding, Y., Cesare, P., Wood, J.N. (2000) A new member of the acid-sensing ion channel family, *Neuroreport*, **11**, 2217–2222.
 71. Babini, E., Paukert, M., Geisler, H.-S., Grunder, S. (2002) Alternative

- splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1), *J. Biol. Chem.*, **277**, 41597–41603.
72. Hruska-Hageman, A.M., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J. (2002) Interaction of the synaptic protein PICK1 (protein interacting with C kinase 1) with the non-voltage gated sodium channels BNC1 (brain Na⁺ channel 1) and ASIC (acid-sensing ion channel), *Biochem. J.*, **361**, 443–450.
73. Zha, X., Costa, V., Harding, A.M.S., Reznikov, L., Benson, C.J., Welsh, M.J. (2009) ASIC2 subunits target acid-sensing ion channels to the synapse via an association with PSD-95, *J. Neurosci.*, **29**, 8438–8446.
74. Cho, J.-H., Askwith, C.C. (2008) Presynaptic release probability is increased in hippocampal neurons from ASIC1 knockout mice, *J. Neurophysiol.*, **99**, 426–441.
75. Coryell, M.W., Ziemann, A.E., Westmoreland, P.J., Haenfler, J.M., Kurjakovic, Z., Zha, X., Price, M., Schnizler, M.K., Wemmie, J.A. (2007) Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit, *Biol. Psychiatry*, **62**, 1140–1148.
76. Wemmie, J.A., Coryell, M.W., Askwith, C.C., Lamani, E., Leonard, A.S., Sigmund, C.D., Welsh, M.J. (2004) Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3621–3626.
77. Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Haenfler, J.M., Allen, J.E., McBride, J.L., Davidson, B.L., Wemmie, J.A. (2008) Restoring Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala of knockout mice rescues fear memory but not unconditioned fear responses, *J. Neurosci.*, **28**, 13738–13741.
78. Ziemann, A.E., Allen, J.E., Dahdaleh, N.S., Drebot, I.I., Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Lynch, C.M., Faraci, F.M., Howard, M.A., Welsh, M.J., et al. (2009) The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior, *Cell*, **139**, 1012–1021.
79. Borzan, J., Zhao, C., Meyer, R.A., Raja, S.N. (2010) A role for acid-sensing ion channel 3, but not acid-sensing ion channel 2, in sensing dynamic mechanical stimuli, *Anesthesiology*, **113**, 647–654.
80. Wetzel, C., Hu, J., Riethmacher, D., Benckendorff, A., Harder, L., Eilers, A., Moshourab, R., Kozlenkov, A., Labuz, D., Caspani, O., et al. (2007) A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse, *Nature*, **445**, 206–209.
81. Drew, L.J., Rohrer, D.K., Price, M.P., Blaver, K.E., Cockayne, D.A., Cesare, P., Wood, J.N. (2004) Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones, *J. Physiol.*, **556**, 691–710.
82. Hildebrand, M.S., de Silva, M.G., Klockars, T., Rose, E., Price, M., Smith, R.J.H., McGuirt, W.T., Christophoulos, H., Petit, C., Dahl, H.-H.M. (2004) Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear, *Hear. Res.*, **190**, 149–160.
83. Ettaiche, M., Deval, E., Pagnotta, S., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2009) Acid-sensing ion channel 3 in retinal function and survival, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 2417–2426.
84. Barnes, C., Tibbitts, T., Sager, J., Deitzer, G., Bubenheim, D., Koerner, G., Bugbee, B. (1993) Accuracy of quantum sensors measuring yield photon flux and photosynthetic photon flux, *HortScience*, **28**, 1197–1200.
85. Huang, S.-J., Yang, W.-S., Lin, Y.-W., Wang, H.-C., Chen, C.-C. (2008)

- Increase of insulin sensitivity and reversal of age-dependent glucose intolerance with inhibition of ASIC3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 729–734.
86. Sluka, K.A., Price, M.P., Breese, N.M., Stucky, C.L., Wemmie, J.A., Welsh, M.J. (2003) Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1, *Pain*, **106**, 229–239.
 87. Vergo, S., Craner, M.J., Etzensperger, R., Attfield, K., Friese, M.A., Newcombe, J., Esiri, M., Fugger, L. (2011) Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model, *Brain*, **134**, 571–584.
 88. Dauer, W., Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models, *Neuron*, **39**, 889–909.
 89. Pidoplichko, V.I., Dani, J.A. (2006) Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11376–11380.
 90. Arias, R.L., Sung, M.-L.A., Vasylyev, D., Zhang, M.-Y., Albinson, K., Kubek, K., Kagan, N., Beyer, C., Lin, Q., Dwyer, J.M., et al. (2008) Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **31**, 334–341.
 91. Dwyer, J.M., Rizzo, S.J., Neal, S.J., Lin, Q., Jow, F., Arias, R.L., Rosenzweig-Lipson, S., Dunlop, J., Beyer, C.E. (2009) Acid sensing ion channel (ASIC) inhibitors exhibit anxiolytic-like activity in preclinical pharmacological models, *Psychopharmacol.*, **203**, 41–52.
 92. Somjen, G.G. (1984) Acidification of interstitial fluid in hippocampal formation caused by seizures and by spreading depression, *Brain Res.*, **311**, 186–188.
 93. Chesler, M., Kaila, K. (1992) Modulation of pH by neuronal activity, *Trends Neurosci.*, **15**, 396–402.
 94. Ali, A., Pillai, K.P., Ahmad, F.J., Dua, Y., Vohora, D. (2006) Anticonvulsant effect of amiloride in pentetrazole-induced status epilepticus in mice, *Pharmacol. Rep.*, **58**, 242–245.
 95. N'Gouemo, P. (2008) Amiloride delays the onset of pilocarpine-induced seizures in rats, *Brain Res.*, **1222**, 230–232.
 96. Weng, J.-Y., Lin, Y.-C., Lien, C.-C. (2010) Cell type-specific expression of acid-sensing ion channels in hippocampal interneurons, *J. Neurosci.*, **30**, 6548–6558.
 97. Rehncrona, S. (1985) Brain acidosis, *Ann. Emerg. Med.*, **14**, 770–6.
 98. Siesjö, B. K., Katsura, K. I., Kristián, T., Li, P. A., Siesjö, P. (1996) Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage, *Acta Neurochir. Suppl.*, **66**, 8–14.
 99. Siesjö, B.K. (1988) Acidosis and ischemic brain damage, *Neurochem. Pathol.*, **9**, 31–88.
 100. Li, M., Inoue, K., Branigan, D., Kratzer, E., Hansen, J.C., Chen, J.W., Simon, R.P., Xiong, Z.-G. (2010) Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 1247–1260.
 101. Pignataro, G., Simon, R.P., Xiong, Z.-G. (2007) Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischemia, *Brain*, **130**, 151–158.
 102. Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., et al. (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms, *Nat. Neurosci.*, **10**, 943–945.
 103. Duan, B., Wu, L.-J., Yu, Y.-Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J.,

- Xu, T.-L. (2007) Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity, *J. Neurosci.*, **27**, 11139–11148.
104. Sutherland, S.P., Benson, C.J., Adelman, J.P., McCleskey, E.W. (2001) Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 711–716.
105. Chu, X.-P., Wemmie, J.A., Wang, W.-Z., Zhu, X.-M., Saugstad, J.A., Price, M.P., Simon, R.P., Xiong, Z.-G. (2004) Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels, *J. Neurosci.*, **24**, 8678–8689.
106. Jiang, Q., Inoue, K., Wu, X., Papsian, C.J., Wang, J.Q., Xiong, Z.G., Chu, X.P. (2011) Cysteine 149 in the extracellular finger domain of acid-sensing ion channel 1b subunit is critical for zinc-mediated inhibition, *Neuroscience*, **193**, 89–99.
107. Jiang, Q., Papsian, C.J., Wang, J.Q., Xiong, Z.G., Chu, X.P. (2010) Inhibitory regulation of acid-sensing ion channel 3 by zinc, *Neuroscience*, **169**, 574–583.
108. Wang, W., Yu, Y., Xu, T.-L. (2007) Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat, *Neuroscience*, **145**, 631–641.
109. Babinski, K., Catarsi, S., Biagini, G., Séguéla, P. (2000) Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd3+, *J. Biol. Chem.*, **275**, 28519–28525.
110. Ugawa, S., Ueda, T., Takahashi, E., Hirabayashi, Y., Yoneda, T., Komai, S., Shimada, S. (2001) Cloning and functional expression of ASIC-beta2, a splice variant of ASIC-beta, *Neuroreport*, **12**, 2865–2869.
111. De Weille, J.R., Bassilana, F., Lazdunski, M., Waldmann, R. (1998) Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel, *FEBS Lett.*, **433**, 257–260.
112. Li, W.-G., Yu, Y., Huang, C., Cao, H., Xu, T.-L. (2011) Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride, *J. Biol. Chem.*, **286**, 42635–42646.
113. Dubé, G.R., Lehto, S.G., Breese, N.M., Baker, S.J., Wang, X., Matulenko, M.A., Honoré, P., Stewart, A.O., Moreland, R.B., Brioni, J.D. (2005) Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels, *Pain*, **117**, 88–96.
114. Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., Lazdunski, M. (2001) Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors, *J. Neurosci.*, **21**, 8026–8033.
115. Garza, A., López-Ramírez, O., Vega, R., Soto, E. (2010) The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic channel currents in dorsal root ganglion neurons from the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **332**, 489–499.
116. Smith, E.S., Cadiou, H., McNaughton, P.A. (2007) Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action, *Neuroscience*, **145**, 686–698.
117. Chen, X., Qiu, L., Li, M., Dürmgel, S., Orser, B.A., Xiong, Z.-G., MacDonald, J.F. (2010) Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels, *Neuropharmacology*, **58**, 1045–1053.
118. Yu, Y., Chen, Z., Li, W.-G., Cao, H., Feng, E.-G., Yu, F., Liu, H., Jiang, H., Xu, T.-L. (2010) A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel, *Neuron*, **68**, 61–72.

119. Wang, X., Li, W.-G., Yu, Y., Xiao, X., Cheng, J., Zeng, W.-Z., Peng, Z., Xi Zhu, M., Xu, T.-L. (2013) Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel, *J. Neurosci.*, **33**, 4265–4279.
120. Dubinnyi, M.A., Osmakov, D.I., Koshelev, S.G., Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Zakaryan, N.A., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Arseniev, A.S., Grishin, E.V. (2012) Lignan from thyme possesses inhibitory effect on ASIC3 channel current, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32993–33000.
121. Askwith, C.C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M.P., Welsh, M.J. (2000) Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels, *Neuron*, **26**, 133–141.
122. Deval, E., Baron, A., Lingueglia, E., Mazarguil, H., Zajac, J.-M., Lazdunski, M. (2003) Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability, *Neuropharmacology*, **44**, 662–671.
123. Sherwood, T.W., Askwith, C.C. (2009) Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death, *J. Neurosci.*, **29**, 14371–14380.
124. Bohlen, C.J., Chesler, A.T., Sharif-Naeini, R., Medzihradzky, K.F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E.E., Burlingame, A.L., Basbaum, A.I., Julius, D. (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain, *Nature*, **479**, 410–414.
125. Escoubas, P., De Wèille, J.R., Le-coq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, F., Lazdunski, M. (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺channels, *J. Biol. Chem.*, **275**, 25116–25121.
126. Chen, X., Kalbacher, H., Gründer, S. (2006) Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent, *J. Gen. Physiol.*, **127**, 267–276.
127. Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M. (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons, *EMBO J.*, **23**, 1516–1525.
128. Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012) Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain, *Nature*, **490**, 552–555.
129. Kozlov, S.A., Osmakov, D.I., Andreev, Y.A., Koshelev, S.G., Gladkikh, I.N., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E.V. (2012) A sea anemone polypeptide toxin inhibiting the ASIC3 acid-sensitive channel, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, **38**, 578–583.
130. Osmakov, D.I., Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Koshelev, S.G., Sanamyan, N.P., Sanamyan, K.E., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Murashev, A.N., Mineev, K.S., et al. (2013) Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity, *J. Biol. Chem.*, **288**, 23116–23127.
131. Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. (2006) Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly, *Neuroscientist*, **12**, 245–260.
132. Sherwood, T.W., Askwith, C.C. (2008) Endogenous arginine-phe-

- nylalanine-amide-related peptides alter steady-state desensitization of ASIC1a, *J. Biol. Chem.*, **283**, 1818–1830.
133. Ostrovskaya, O., Moroz, L., Krishnal, O. (2004) Modulatory action of RFamide-related peptides on acid-sensing ionic channels is pH dependent: the role of arginine, *J. Neurochem.*, **91**, 252–255.
134. Wang, W.-Z., Chu, X.-P., Li, M.-H., Seeds, J., Simon, R. P., Xiong, Z.-G. (2006) Modulation of acid-sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca²⁺, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH, *J. Biol. Chem.*, **281**, 29369–29378.
135. Zhang, P., Sigworth, F.J., Canessa, C.M. (2006) Gating of acid-sensitive ion channel-1: release of Ca²⁺ block vs. allosteric mechanism, *J. Gen. Physiol.*, **127**, 109–117.
136. Duan, B., Wang, Y.-Z., Yang, T., Chu, X.-P., Yu, Y., Huang, Y., Cao, H., Hansen, J., Simon, R.P., Zhu, M.X., et al. (2011) Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis, *J. Neurosci.*, **31**, 2101–2112.
137. Adams, C.M., Snyder, P.M., Welsh, M.J. (1999) Paradoxical stimulation of a DEG/ENaC channel by amiloride, *J. Biol. Chem.*, **274**, 15500–15504.
138. Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Nishigaki, M., Shibata, Y., Shimada, S. (2002) Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors, *J. Clin. Invest.*, **110**, 1185–1190.
139. Hamill, O.P., McBride, D.W. (1996) The pharmacology of mechanogated membrane ion channels, *Pharmacol. Rev.*, **48**, 231–252.
140. Dorofeeva, N.A., Barygin, O.I., Staruschenko, A., Bolshakov, K.V., Magazanik, L.G. (2008) Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons, *J. Neurochem.*, **106**, 429–441.
141. Raisinghani, M., Premkumar, L.S. (2005) Block of native and cloned vanilloid receptor 1 (TRPV1) by aminoglycoside antibiotics, *Pain*, **113**, 123–133.
142. Yu, Y., Li, W.-G., Chen, Z., Cao, H., Yang, H., Jiang, H., Xu, T.-L. (2011) Atomic level characterization of the nonproton ligand-sensing domain of ASIC3 channels, *J. Biol. Chem.*, **286**, 24996–25006.
143. Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Korolkova, Y.V., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Skobtsov, D.I., Murahev, A.N., Kotova, P.D., Rogachevskaja, O.A., Kabanova, N.V., et al. (2013) Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia, *Mar. Drugs*, **11**, 5100–5115.
144. Norton, R.S., Pallaghy, P.K. (1998) The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides, *Toxicon*, **36**, 1573–1583.
145. Swartz, K.J., MacKinnon, R. (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula, *Neuron*, **15**, 941–949.
146. Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Grishin, E.V. (2009) Molecular diversity of spider venom, *Biochem.*, **74**, 1505–1534.
147. Chen, X., Kalbacher, H., Gründer, S. (2005) The tarantula toxin psalmitoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity, *J. Gen. Physiol.*, **126**, 71–79.
148. Saez, N.J., Mobli, M., Bieri, M., Chassagnon, I.R., Malde, A.K., Gamsjaeger, R., Mark, A.E., Goolley, P.R., Rash, L.D., King, G.F. (2011) A dynamic pharmacophore drives the interaction between Psal-

- motoxin-1 and the putative drug target acid-sensing ion channel 1a, *Mol. Pharmacol.*, **80**, 796–808.
149. Qadri, Y.J., Berdiev, B.K., Song, Y., Lipperton, H.L., Fuller, C.M., Benos, D.J. (2009) Psalmotoxin-1 docking to human acid-sensing ion channel-1, *J. Biol. Chem.*, **284**, 17625–17633.
150. Sherwood, T., Franke, R., Conneely, S., Joyner, J., Arumugan, P., Askwith, C. (2009) Identification of protein domains that control proton and calcium sensitivity of ASIC1a, *J. Biol. Chem.*, **284**, 27899–27907.
151. Bacongus, I., Gouaux, E. (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes, *Nature*, **489**, 400–405.
152. Bacongus, I., Bohlen, C.J., Goehring, A., Julius, D., Gouaux, E. (2014) X-Ray Structure of Acid-Sensing Ion Channel 1–Snake Toxin Complex Reveals Open State of a Na⁺-Selective Channel, *Cell*, **156**, 717–729.
153. Kini, R.M., Doley, R. (2010) Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets, *Toxicon*, **56**, 855–867.
154. Schroeder, C.I., Rash, L.D., Vila-Farrés, X., Rosengren, K.J., Mobli, M., King, G.F., Alewood, P.F., Craik, D.J., Durek, T. (2014) Chemical Synthesis, 3D Structure, and ASIC Binding Site of the Toxin Mambalgin-2, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 1017–1020.
155. Kozlov, S., Grishin, E. (2012) Convenient nomenclature of cysteine-rich polypeptide toxins from sea anemones, *Peptides*, **33**, 240–244.
156. Chagot, B., Escoubas, P., Diochot, S., Bernard, C., Lazdunski, M., Darbon, H. (2005) Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels, *Protein Sci.*, **14**, 2003–2010.
157. Anangi, R., Chen, C.-C., Lin, Y.-W., Cheng, Y.-R., Cheng, C.-H., Chen, Y.-C., Chu, Y.-P., Chuang, W.-J. (2010) Expression in *Pichia pastoris* and characterization of APETx2, a specific inhibitor of acid sensing ion channel 3, *Toxicon*, **56**, 1388–1397.
158. Anangi, R., Rash, L.D., Mobli, M., King, G.F. (2012) Functional expression in *Escherichia coli* of the disulfide-rich sea anemone peptide APETx2, a potent blocker of acid-sensing ion channel 3, *Mar. Drugs*, **10**, 1605–1618.
159. Karczewski, J., Spencer, R.H., Garsky, V.M., Liang, A., Leidl, M.D., Cato, M.J., Cook, S.P., Kane, S., Urban, M.O. (2010) Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2, *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 950–960.
160. Blanchard, M.G., Rash, L.D., Kellenberger, S. (2012) Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 2167–2177.
161. Peigneur, S., Béress, L., Möller, C., Mari, F., Forssmann, W.-G., Tytgat, J. (2012) A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins, *FASEB J.*, **26**, 5141–5151.